

高度な選択性を有する安全な害虫制御剤の探索と作用機構に関する研究

Search for highly selective insectistatics and their mode of action

- 代表研究者 理化学研究所主任研究員 満井 喬
Chief Scientist, The Institute of Physical and Chemical Research
Takashi MITSUI
- 協同研究者 京都大学農学部教授 藤田 稔夫
Prof., Dept. of Agricultural Chem., Kyoto Univ.
Toshio FUJITA
- 東京農業大学総合研究所 大沢 貫寿
Assist. Prof., Nodai Res., Inst., Tokyo Univ. of Agriculture
Kanju OHSAWA

The *in vivo* assay methods for insectistatics were established by using young instar larvae and eggs of 7 species of insects and mites. The authentic compounds which have been known as insectistatics were applied to these larvae and eggs and their activities were evaluated in the following 6 items: lethal effect, growth inhibitory effect, anti-feeding effect, inhibitory effect on molting, precocious metamorphosis and inhibitory effect on metamorphosis. Each compound has any activity among these items against at least one of these insect species. The synthetic compounds and the extracts of the plants from Indonesia were screened by using the assay methods. Two substances from *Annona squamosa* and *Annona grabra* were found to be active to some insect species, especially to Lepidopteran insects. The chemical structure of the substance from *A. squamosa* was estimated to be 3-[13-[5'-[2, 5-dihydroxyundecyl]-octahydro-[2, 2'-bifuran]-5-yl]-13-hydroxytridecyl]-5-methyl-2(5H)-furanone.

Epidermis was explanted from the last instar larva of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, and implanted into the penultimate instar larva. During the molt of the host, the epidermis responded to the host's hormonal milieu and formed a new cuticle. Larval cuticle formation by the epidermis was highest in the larva younger than day 1 and decreased rapidly between 2 and 3 days after molt. Thereafter, larval cuticle was no longer obtained. The results suggest the switchover from larval to pupal commitment occurs on day 2. When epidermis derived from day 0 larva was preincubated in Grace's medium for varying lengths of time and implanted into the host, larval cuticle formation linearly decreased as duration of preincubation was longer; from 80% larval without preincubation to 0% at 72 hr-preincubation. When juvenile hormone I (JH-I) was present in the medium, larval cuticle formation was maintained even 72 hr after initiation of preincubation. By contrast, β -ecdysone rapidly proceeded pupal commitment and no larval cuticle was obtained in the first 24 hr of preincubation. Once the cells were committed to produce pupal cuticle, subsequent exposure to JH-I *in vitro* was unable to reverse the change of commitment. Thus, it was concluded that the change of commitment in *Mamestra* was due to not only the elimination of JH from the epidermal cells but also exposure to β -ecdysone. This implantation system can be used as an *in vitro* assay method for juvenile hormone and anti-juvenile hormone activities. JH-I prevented pupal commitment at 10^{-8} M. Methoprene was about 1/70 as active as JH-I and JH-III was almost inactive. EMD, ETB and KK-42, known as anti-JHs, did not inhibit JH-activity in this system, probably because they have other mechanisms than the competition at the receptor site.

The larvicidal activity of benzoylphenylureas against the third instar of rice stem borers and

the knockdown activity of tetramethrin and analogs against adult-female house flies were measured under synergistic conditions with metabolic inhibitors. The inhibitory activity of benzoylphenylureas in the new cuticle formation in cultured integuments of rice stem borers and the neuroexcitatory and blocking activities of tetramethrin and analogs against the excised central nerve cord of American cockroaches were also measured. Variations of each activity were quantitatively analyzed using physicochemical substituent and molecular parameters of the compounds. For the benzoylphenylureas, the greater the hydrophobicity and the electron-withdrawing property as well as the smaller the steric bulkiness of the *ortho* substituents on the benzoylbenzene ring, the higher was the larvicidal activity. Introduction of substituents at the *para*-position of the aniline moiety of the compounds with electron-withdrawing and highly hydrophobic properties increased the activity. Introduction of substituents with narrow dimension to the direction perpendicular to the bond axis between the benzene ring and the α -atom of the substituents was favorable for the activity. Variations of the larvicidal activity of benzoylphenylureas were positively correlated with those of the inhibitory activity in the new cuticle formation when their molecular hydrophobicity factors were separated. The knockdown activity of tetramethrin and analogs with a symmetry plane in their alcohol moiety was about twice on the molar basis that expected from those of compounds without the factor. Separating this factor, variations of the activity were parabolically related to the steric bulkiness of the molecule. The greater the hydrophobicity, the higher was the activity. The neurophysiological activities of compounds with the symmetry factor were again about twice those expected from activities of compounds without the factor. Taking into consideration of the symmetry factor, variations of the neuroexcitatory activity were parabolically related to the steric bulkiness of the compounds and linearly related to the hydrophobicity. Variations of the neuroblocking activity were found to be parabolically related to the molecular hydrophobicity.

Mode of inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron was studied by using the midguts of the final instar larvae of the cabbage armyworm. Diflubenzuron strongly inhibited chitin synthesis in the peritrophic membranes of the midguts when ^{14}C -*N*-acetylglucosamine (AGA) was applied as a precursor of chitin. However, accumulation of ^{14}C -UDP-AGA was observed in the diflubenzuron-treated midguts. From these results, the mode of action of diflubenzuron seemed to be the inhibition of UDP-AGA transport across biomembranes. The brush-border membrane vesicles were isolated from the midgut epithelial cells. Binding of ^{14}C -UDP-AGA to the vesicles showed that the brush-border membrane vesicles had two substances bound to UDP-AGA, one was chitin synthetase and the other might be UDP-AGA transporter which was partially inhibited by diflubenzuron.

The mechanism of resistance to teflubenzuron was studied by using the susceptible and resistant strains of the diamond back moth, *Plutella xylostella*. No difference was observed in absorption and translocation of teflubenzuron, when ^{14}C -teflubenzuron was applied to the larvae of both strains. Chitin synthetase activity and amount of chitin were compared between both strains before and after molt. The susceptible strain larvae produced much amount of chitin rapidly after molt. On the other hand, the resistant strain larvae synthesized enough amount of chitin for next instar during molt. This difference seems to be one of the resistant mechanism.

研究目的

近年、害虫防除の概念は、従来の毒物による「殺虫」の概念から、昆虫の成長や生殖を抑えることによって生息密度を抑える「制虫」へと変化しつつある。本研究は昆虫に固有の生理・生態制御機構の研究から得られる生体情報に基づき、害虫生息密度を被害許容限度内にとどめる害虫制御剤

を開発することを主な目的としている。昆虫は、脱皮、変態、生殖などに昆虫固有の生理作用を有しているので、この制御機能を攪乱すれば、標的有害昆虫に選択的に作用し、非標的生物や環境へ悪影響を及ぼさない有効かつ安全な害虫制御剤を創製しうる可能性がある。それを実現する手段として、生理活性物質の生物検定法を開発し、有

機合成化合物や、植物に由来する新規活性物質を探索・利用することを目指した(研究Ⅰ)。また、昆虫生理活性物質の化学構造と生物活性の相関を解析することにより、活性発現のための構造要件を求め、よりすぐれた活性物質の創製を試みた(研究Ⅱ)。さらに、害虫制御剤の作用機構、体内吸収移行性、選択性の発現機構を生理・生化学的に解明することによって新たな展開を期待した(研究Ⅲ)。

研究経過

(研究Ⅰ) 昆虫生理活性物質の生物検定法の確立とその応用

7種類の昆虫の若齢幼虫を供試し、すでに生理活性の知られている既知化合物に対する反応を観察することによって生理活性検定法を確立した。この検定法を応用し、有機合成化合物約300検体、熱帯(インドネシア)産植物の抽出物約200検体の活性検定を行い、後者から成長阻害作用物質2種を見いだした。

昆虫の変態には、幼若ホルモン(JH: juvenile hormone)と脱皮ホルモン(ecdysone)が関与する。ヨトウガ終齢幼虫の真皮を供試し、*in vitro*での器官培養によって変態のメカニズムを解明すると同時に、ホルモン剤および抗ホルモン剤の*in vitro*での活性検定に応用し得ることを示した。

(研究Ⅱ) 昆虫生理活性物質の化学構造と生物活性

ベンゾイルフェニルウレア類(図1, 化合物Ⅰ)

の2個のベンゼン環のうち、ベンゾイル側にはオルト位に種々の置換基を導入し、アニリン側にはパラ位に置換基を導入した化合物を多数合成した。これら2系列の化合物群各々についてニカメイチュウ3令幼虫に対する殺虫活性を測定し、その大きさと、置換基のもつ種々の物理化学的性質との相関関係について定量的な解析を行い、高活性を与える構造上の因子について検討した。また、ニカメイチュウ幼虫より切りとった皮膚を培養し、これらの化合物の表皮形成阻害活性を測定した。一連の化合物の殺虫活性の大きさと、このような*in vitro*における活性の大きさととの関係についても解析し、ベンゾイルフェニルウレア類の作用機構について考察した。

菊酸エステル的一种であるテトラメスリン(図1の化合物Ⅱ: R=a)のアルコール部を、一連のイミド-N-メチロール、およびラクタム-N-メチロール構造に変換した化合物を合成した。これらの化合物のイエバエ雌成虫に対するノックダウン活性と、ワモンゴキブリの中樞神経索に対する異常興奮誘起と興奮の伝導遮断活性とを測定し、それぞれの活性の大きさと化学構造との関係を、化合物がもつ物理化学的性質をパラメーターとして定量的に解析した。

(研究Ⅲ) 制虫剤の作用機構および選択性の発現機構

昆虫表皮のキチン質の合成阻害に基づく制虫剤として既に実用化されているベンゾイルフェニル

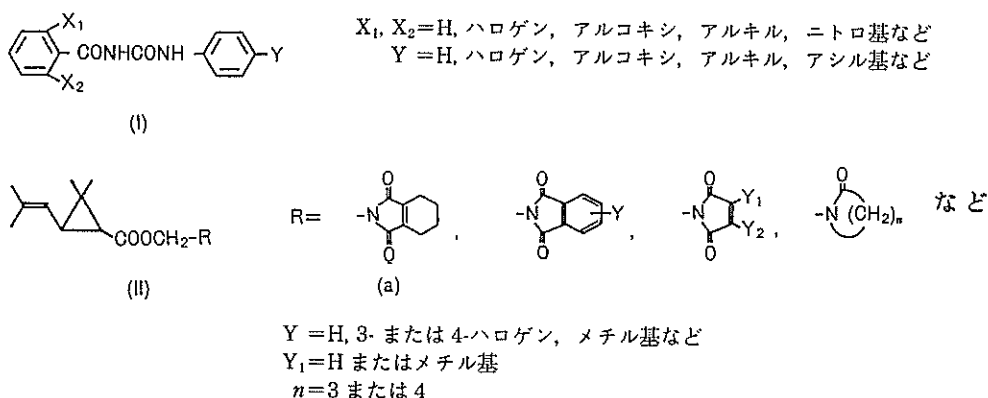


図1. ベンゾイルフェニルウレア類(Ⅰ)とテトラメスリン(Ⅱ: R=a)誘導体

表 1.

化合物とその作用	供 試 昆 虫	反 応
Methoprene (幼若ホルモン作用)	ハチミツガ チャバネゴキブリ ツマグロヨコバイ	1~10 $\mu\text{g}/\text{animal}$ で変態阻害 10 mg/ml で脱皮阻害 1~10 mg/ml で脱皮阻害および変態阻害
Epfenonane (幼若ホルモン作用)	ハチミツガ チャバネゴキブリ	0.1~1 $\mu\text{g}/\text{animal}$ で変態阻害 10 mg/ml 以上で脱皮阻害
KK-42 (抗幼若ホルモン作用)	カイコガ	1~10 $\mu\text{g}/\text{animal}$ で早熟変態
Buprofezin (キチン合成阻害作用)	ニジュウヤホシテントウ ツマグロヨコバイ	0.1 mg/ml で脱皮阻害 0.01 mg/ml で脱皮阻害
Avermectin (神経系, GABA, の殺虫作用)	ヨトウガ ツマグロヨコバイ ナミハダニ	1 mg/ml 致死効果 0.1 mg/ml 致死効果 0.1 mg/ml 殺卵効果
Fenvalerate (ピレスロイド系殺虫剤)	ヨトウガ ニジュウヤホシテントウ チャバネゴキブリ ツマグロヨコバイ	0.1 mg/ml 致死効果 0.1 mg/ml 致死効果 1 mg/ml 致死効果 0.01 mg/ml 致死効果
Azadirachtin (摂食忌避作用)	ヨトウガ* ツマグロヨコバイ	0.1 mg/ml で摂食忌避 0.1 mg/ml で成育阻害 0.1 mg/ml で致死効果

* 処理葉, 無処理葉を共に与えた場合は摂食忌避, 処理葉のみを与えた場合は若干摂食し, 摂食後の成育が阻害される。

ウレア系化合物の作用機構の解明をヨトウガ終齢幼虫の中腸を供試して行った。その結果については既に、初年度報告したとおり、キチンの前駆物質である UDP-N-acetylglucosamine の生体膜透過を抑制する。また、ベンゾイルフェニルウレア系化合物は十字科野菜やキャベツの大害虫であるコナガ (*Plutella xylostella*) に卓効を示すが、一部地域では全く効果を示さない。すなわち、抵抗性のコナガの出現がみられる。そこで、抵抗性コナガを導入し、選択性発現機構の解明を試みた。

研究成果

(研究 I) 昆虫生理活性物質の生物検定法の確立とその応用

1) *in vivo*

ここに供試された昆虫は以下の7種である。ヨトウガ (*Mamestra brassicae*) 3 齢幼虫, カイコガ (*Bombyx mori*) 3 または 4 齢幼虫, ハチミツガ (*Galleria mellonella*) 終齢幼虫, ニジュウヤホシテントウ (*Henosepilachna vigintioctopunctata*) 2

齢幼虫, チャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) 1 齢幼虫, ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*) 2 齢幼虫, ナミハダニ (*Tetranychus urticae*) 卵。すべて当研究室で累代飼育中の系統を供試した。供試薬剤はアセトンに溶解し、飼料となる植物に塗布または噴霧し、風乾後食草として与える接触法を用いた。ただし、カイコガおよびハチミツガ幼虫に対しては、薬液を腹部背面に滴下する局所施用法で投薬した。薬剤処理 24 時間後からは無処理飼料を与え、10 日~2 週間にわたって観察を続けた。薬剤の評価は以下の6項目について行った。①殺虫 (致死) 効果 (処理 1~3 日後の死虫率), ②成育阻害効果, ③摂食忌避効果, ④脱皮阻害効果 (抗脱皮ホルモン作用), ⑤早熟変態効果 (抗幼若ホルモン作用), ⑥変態阻害効果 (幼若ホルモン作用)。最初に既知生理活性物質の各昆虫に及ぼす反応について調査した。その結果を表 1 に要約した。

以上のように、これら7種の昆虫を供試すれば

表 2.

植 物	対 象 昆 虫	作 用
<i>Annona squamosa</i>	ヨトウガ	10 mg/ml** 摂食忌避および成育抑制
	コナガ	0.1 mg/ml 致死および成育抑制
	ニジュウヤホシテントウ	10 mg/ml 致死
	ツマグロヨコバイ	10 mg/ml 致死
	<i>crocidolomia</i>	1 mg/ml 成育抑制
<i>Annona glabra</i>	ヨトウガ	10 mg/ml 摂食忌避および成育抑制
	コナガ	0.1 mg/ml 致死および成育抑制
	ニジュウヤホシテントウ	10 mg/ml 致死および成育抑制
	ツマグロヨコバイ	10 mg/ml 致死
	<i>crocidolomia</i>	10 mg/ml 成育抑制
<i>Cosmos caudatus</i>	シロイチモジヨトウ***	致 死

** 濃度は抽出物の濃度を示す。有効成分濃度は更にこれ以下である。

*** 現地に試験を依頼した結果である。当研究室では現在試験を実施中

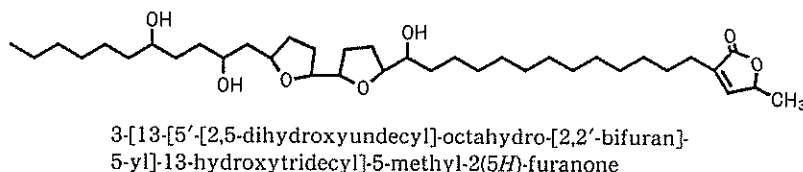


図 2. The estimated chemical structure of the active ingredient from *Annona squamosa*.

いずれの生理活性も検定することが可能である。この方法を応用して、約 300 種の有機合成化合物および約 200 種のインドネシア産植物の有機溶剤抽出物を検定した結果、*Annona squamosa*, *Annona glabra* の 2 種の抽出物に活性を認めた。また、*Cosmos caudatus* の抽出物は現地に試験を依頼し活性が見いだされたもので、当研究室で現在活性検定を実施中である。これらは主にリン翅目幼虫に有効であったので、コナガ (*Plutella xylostella*), *Crocidolomia minotalis* (インドネシアの害虫で日本には分布しない。当研究室で累代飼育している), シロイチモジヨトウ (*Spodoptera exigua*) に対する作用も調べ、表 2 の結果を得た。

Annona squamosa の有効成分は精製し、構造決定を行った結果 3-[13-[5'-[2,5-dihydroxyundecyl]-octahydro-[2,2'-bifuran]-5-yl]-13-hydroxytridecyl]-5-methyl-2(5H)-furanone (図 2 に構造を示した) であろうと推定された。他の二つについては未だ構造が決定されていない。

2) *in vitro* 検定法

ヨトウガ終齢 (6 齢) 幼虫から真皮を無菌的に切り出し、これを 3×3 mm 程度の小片として、いろいろなホルモン条件下で 24~72 時間 *in vitro* で培養する。次に、この小片を 5 齢幼虫の腹部に移植し、ホストが脱皮した時にこれを取り出す。移植した小片はシストを形成し、その内部に新しい表皮を形成する。そして、この表皮は培養時のホルモン条件に従って幼虫表皮、蛹表皮あるいは両者のモザイクになることが明らかとなった。この方法を応用して、まず幼虫から蛹へと転換する時期について検討した。5 齢および終齢脱皮後所定時間経過した幼虫から真皮を取り出し、移植実験を行った結果、図 3 に示すように、5 齢では完全な幼虫型の表皮を、終齢 1 日以内ではほとんど幼虫型の表皮を生ずる。その後、2 日~3 日目にかけて急速に幼虫から蛹へと転換 (commitment という) が進み、60~90% が蛹の表皮を形成する。そして、4 日目には完全に蛹へと転換が完了することが明らかとなった。次に終齢 1

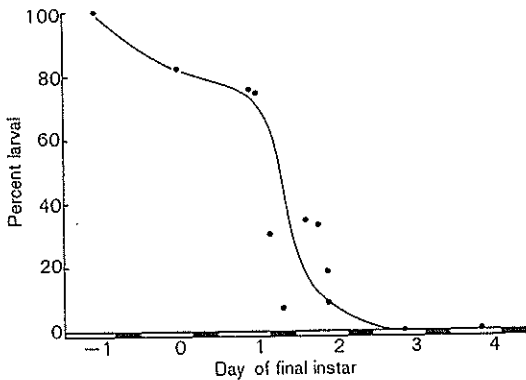


図3. 終齢幼虫の蛹への commitment の時期

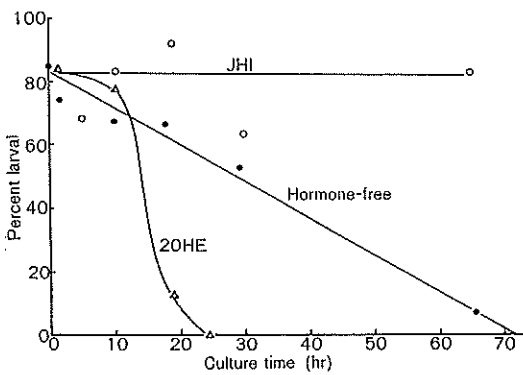


図4. 培地 (*in vitro*) での JH-I および ecdysterone の commitment に及ぼす影響

日以内の幼虫から表皮を無菌的に切り出し（この時期の真皮は未だ幼虫表皮形成能力を有している）、脱皮ホルモン（20-hydroxyecdysone, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）または、幼若ホルモン（JH-I）を含む Grace's 培地、あるいはホルモンを含まない Grace's 培地で一定時間培養した後、これを5齢2日目の幼虫に移し、シスト中に形成された表皮の性質を調べたところ図4に示す結果を得た。すなわち、脱皮ホルモンを含む培地で約20時間培養すると、幼虫から蛹への commitment は急速に進行し、得られる表皮はすべて蛹となる。一方、幼若ホルモン存在下で培養すると、72時間培養後も幼虫表皮を形成する。ホルモンを含まない条件下で培養すると、時間経過とともに commitment が進行し、72時間後にはほとんど commitment が完了する。この結果から、ヨトウガの幼虫から蛹の

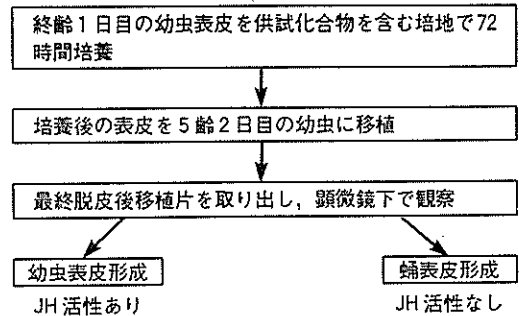


図5. 幼若ホルモン検定の概要

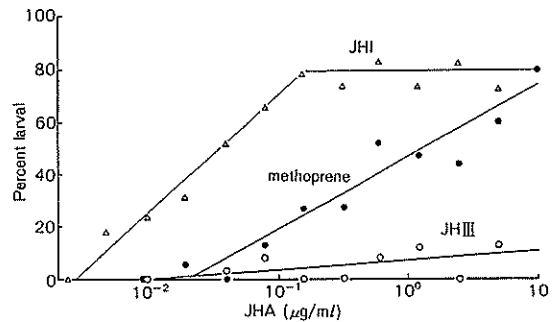


図6. JH-I, III および Methoprene の JH 効果

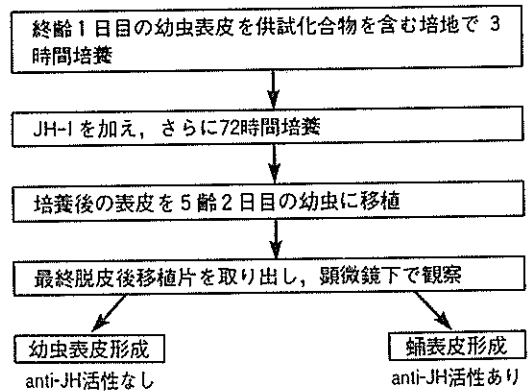


図7. 抗幼若ホルモン検定の概要

転換は、幼若ホルモンが消失することによって徐々に進行し、脱皮ホルモンによってその速度が早められると結論された。

上記の方法を幼若ホルモン作用物質あるいは抗幼若ホルモン物質の検定に応用することができる。図5に示す操作に従って、JH-III および methoprene を検定すると図6の結果が得られ

た。すなわち、methoprene は幼若ホルモン (JH-I) の約 1/70 の活性を持ち、JH-III はほとんど活性を示さない。これらの化合物は *in vivo* で投与してもほぼ同じ結果が認められている。一方、上記検定系に、あらかじめ幼若ホルモンと拮抗する物質 (抗幼若ホルモン) を加えておくと、真皮細胞の幼若ホルモンレセプターにおいて拮抗するため、その後幼若ホルモンを加えても理論的にはその効果が発現しないことになる。したがって、図 7 に示すような抗幼若ホルモンの検定が考えられる。そこで、リン翅目に対して抗幼若ホルモン活性 (早熟変態) を示す物質として知られる EMD, ETB, KK-42 についても検定を行った。その結果、3 化合物とも幼虫型の表皮を得た。すなわち、抗幼若ホルモン活性は見られなかった。この 3 化合物は、JH レセプターにおける JH との拮抗以外のメカニズムに基づく抗幼若ホルモン物質であろうと考えられる。

(研究 II) 昆虫生理活性物質の化学構造と生物活性

近年、種々の昆虫生育制御物質が見いだされ、ある種の化合物は新しい型の生育制御剤として開発されている。ベンゾイルフェニルウレアの一種であるジフルベンズロン (図 1 の化合物 I: $X_1 = X_2 = F, Y = Cl$) もその一種であり、幼虫の脱皮前におけるクチクルの生合成を阻害することがその作用機構であると考えられている。

本研究では、図 1 における化合物 (I) の X_1, X_2 および Y に種々の置換基を導入した化合物を多数合成し、それらのニカメイチュウ幼虫に対する殺虫活性を測定した。ニカメイチュウ幼虫は薬物に対する酸化代謝活性をもっており、事実供試した化合物の中には、酸化代謝の阻害剤であるピペロニルブトキシドの併用で、殺虫活性が約 100 倍上昇する場合もあった。したがって本研究では、代謝の効果を除いた化合物固有の殺虫活性の値について定量的な解析を行うために、ピペロニルブトキシド併用条件下で活性を測定した。薬剤のジメチルスルフォキシド溶液を幼虫の腹部背板に局所投与し、ピペロニルブトキシドを含むニカメイチュウ飼育用合成培地で 5 日間飼育した。その時

点での致死率より 50%致死薬量 (LD_{50} , mmol/insect) を化合物ごとに求め、その逆対数値を活性の指標として解析に用いた。

まず、化合物 (I) の Y を Cl とし、 X_1 および X_2 を種々変化させた化合物群について、化学構造の変化と殺虫活性の大きさとの関係を解析した結果、ベンゾイル側ベンゼン環のオルト位には電子吸引力および疎水性が大きく、立体的に小さい置換基を導入したときに高い殺虫活性の得られることが分かった。次に化合物 (I) の X_1 および X_2 を F とし、 Y を種々の置換基に変換した化合物群についても解析したところ、 Y についても、電子吸引性と疎水性が大きいくほど殺虫活性が大きくなるが、立体的には、置換基の横幅が小さい方が高活性を与えるのに有利であることが明らかになった。このような解析結果から、高い殺虫活性の得られることが期待されたフェニルアルコキシ基などを Y として導入した化合物を合成して殺虫活性を測定したところ、予想どおり高い殺虫活性のあることが確認できた。

一連のベンゾイルフェニルウレア類の殺虫効果が、いわれているように昆虫の表皮形成阻害によるものであれば、これら 2 種類の生理活性の大きさの化合物間での変化は互いによく対応するはずである。このことを検証するために、まずフェニルウレア類の表皮形成阻害活性を化合物ごとに測定した。合成培地で無菌飼育したニカメイチュウの表皮を切りとり、それを脱皮ホルモンを含む培地で 24 時間培養した。このようにして脱皮を誘導した皮膚切片を、ホルモンを含まず薬剤を含む培地でひき続いて 3 日間培養した。この場合にも殺虫試験の場合と同じく、化合物の種類によってはピペロニルブトキシドの併用で生理活性が約 100 倍上昇することがあったので、化合物固有の阻害活性値を求めるためこの酸化代謝阻害剤の併用条件下で培養した。表皮形成の 50%阻害値である $I_{50}(M)$ を化合物ごとに求め、その逆数の対数値を生理活性の指標として解析に用いた。解析の結果、化合物 (I) のベンゾイル部置換基 X_1, X_2 を変化させた化合物についても、アニリン部置換基 Y を変化させた化合物についても、化合物の

輸送の過程を反映すると思われる疎水性の効果を別途考慮すると、殺虫活性の変化は、表皮形成阻害活性の変化と直接対応づけられることが分かった。この結果は、これらの化合物の殺虫効果が、昆虫の表皮形成阻害効果によることを示すものであった。

ピレスロイドは、除虫菊に含まれる殺虫性有効成分の合成類縁体であり、一般に殺虫活性とノックダウン活性の高い化合物群である。ピレスロイドの一種であるテトラメスリン（図1の化合物Ⅱ：R=a）は、特にノックダウン活性が高いことが知られている。本研究では、テトラメスリンにイミド構造が含まれていることに着目し、エステルのアルコール部を図1においてRで示すような種々のイミドやラクタム構造に変換した一連の菊酸エステル類を合成した。そして、それらのイエバエに対するノックダウン活性を測定し、活性の大きさと化合物のもつ物理化学的性質との関係を定量的に解析して、高いノックダウン活性をもたらすための構造条件を明らかにするために研究を行った。

イエバエ成虫は、薬物に対し高い代謝活性をもっている。本研究に供試した化合物群においても、酸化代謝阻害剤の一種であるピペロニルブトキシドの併用条件下で2~8倍、加水分解代謝の阻害剤であり、一種のベンゼンフォスフォネ酸エステルであるNIA 16388の併用条件下でさらに2~8倍活性が上昇したので、本研究では化合物固有のノックダウン活性を求めため、両阻害剤の併用条件下でこの効果を測定した。このような条件下では通常ノックダウン率は時間経過とともに上昇したが、薬剤のメタノール溶液を昆虫の腹部腹面に局所法で投与後2~3時間でそれぞれの薬量ごとに一定値に達した。このような一定の効果をもたらす時点におけるノックダウン率から、50%のイエバエをノックダウンさせる薬量(KD₅₀, mol/insect)を化合物ごとに求めた。供試した一群の化合物の中ではテトラメスリン（図1の化合物Ⅱ：R=a）の活性が最も高く、最も低い値をもつ化合物との間でmol薬量単位で約300倍の差のあることが分かった。化合物の立体的か

さ高さや疎水性が同じであっても、分子のアルコール部に対称面のある化合物のノックダウン活性は、それが無い化合物の値に比べて約2倍高くなった。このことを別途考慮すると、ノックダウン活性の大きさは、化合物の立体的かさ高さに関して放射線状に変化し、この活性にとって最適となるかさ高さは、図1の化合物(Ⅱ)においてRがフタルイミドに近い大きさを持つ構造であることが分かった。さらにこの活性は、化合物の疎水性が高いほど大きくなることも分かった。

ノックダウン効果を含めて、ピレスロイドの昆虫に対する中毒症状における効果は、昆虫の神経系に対する作用によると考えられている。構造活性相関の立場からこのことを検証するために、モデル材料としてワモンゴキブリより摘出した中枢神経索を用い、それに対する作用を電気生理学的に調べた。神経活性の指標として、異常興奮誘起活性と興奮の伝導遮断活性を選び、それぞれの活性の化合物間での変化を解析した。その結果、ノックダウン活性の場合と同じく、アルコール部に対称面をもつ化合物の活性値は、もたないものに対し約2倍高くなった。この効果を分離して考察すると、異常興奮誘起活性の変化は分子の立体的かさ高さに関して放射線状に変化した。さらに化合物の疎水性が高い方が異常興奮の誘起に好都合となった。また、伝導遮断活性の大きさは分子の疎水性に関して放射線状に変化し、この効果をもたらすのに最適となる疎水性のあることが分かった。このように、ノックダウン活性と、摘出神経を用いて測定した生理活性における構造依存性には、ある種の類似点のあることが明らかになった。今後、ゴキブリの摘出神経を用いて得たこのような結果を生かして、イエバエのノックダウン効果における作用機構について検討する予定である。

(研究Ⅲ) 制虫剤の作用機構及び選択性の発現機構

ベンゾイルフェニルウレア系化合物のキチン合成阻害作用機構についてはすでに初年度報告で詳しく述べているのでここではごく簡単に要約する。昆虫の中腸内部は、キチンから成る囲食膜が

上皮細胞を覆ってこれを保護している。無菌飼育したヨトウガ終齢幼虫から中腸をとり出し、*in vitro* で、 ^{14}C -*N*-acetylglucosamine (AGA) の存在下で培養し、囓食膜のキチンに取り込まれる AGA 量を測定した。その結果、diflubenzuron (ベンゾイルフェニルウレア化合物の一つ) は、キチンへの AGA の取り込みを抑えるが、キチンの前駆物質である UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-AGA) の生成は抑えず、むしろこれが細胞内に蓄積することが明らかとなった。次に上皮細胞の表面の microvilli を集め刷子縁膜を調整した。そして、刷子縁膜中に UDP-AGA と特異的に結合する物質が存在し、これが UDP-AGA の膜透過に必要な transporter の役割を果たしていると考えられた。そして、この transporter と UDP-AGA の結合を diflubenzuron が阻害すると結論された。

ベンゾイルフェニルウレア系化合物の一つである teflubenzuron はコナガに卓効を示す。しかし一部地域では teflubenzuron に全く感受性のない抵抗性の系統が出現している。抵抗性系統 (R 系) は感受性系統 (S 系) に比して、*in vivo* で約 20,000 培の抵抗性を持つことが分かった。R および S 系幼虫に ^{14}C -teflubenzuron を経口的に投与すると体内へのとり込み、体内移行には全く差が認められなかった。次に、終齢脱皮直後の幼虫の表皮を ^{14}C -AGA 存在下で *in vitro* で培養し、キチンへ AGA のとり込みを比較したところ、R 系では S 系の 1/3 と少ないことが明らかとなったので、両者のキチン合成酵素活性、表皮に含まれるキチン含量を比較した。その結果、S 系では脱皮後急速にキチンが合成されるに反して R 系では、脱皮時に既にその齢に必要なキチン量の大半を合成し終えているために、teflubenzuron に対して感受性が低いと考えられた。

今後の課題と発展

本研究の主な目的は新しい害虫制御剤 (制虫剤) を探索することであり、そのアプローチとして ①熱帯、亜熱帯植物から活性のあるリード化合物を発見する (lead generation) ②既に活性が知られている化合物をリードとしてこれからさらに

活性の高いものを見いだす (lead evolution) 二つの手段を考えた。前者については、*in vivo*, *in vitro* の検定法を確立することができ、これを用いて有効な物質を得たことは一応の成果と考えている。本実験遂行に当たっての問題は植物入手の困難であった。現地でのよきパートナーを得ること、採集した植物をいかに持ち帰るか、この 2 点ではかなり苦勞を要した。幸い本研究により、現地とのパイプは得られたので、今後はより効率的に研究を進めていきたい。

後者については、構造活性相関、作用機構、選択性発現機構の解明の研究を行い当初の目的はある程度達成することができた。しかし、これらの研究が lead evolution には直接つながらなかったことは残念であったが、この研究をさらに続けても lead evolution につなげることは至って困難であろう。そこで、今後は昆虫の生理・生化学的研究から得られる生体情報を基盤として新しい制虫剤を創製する方向へと発想の転換をはかっている。当研究室 (理研) では昆虫の体色を制御し、フェロモンの合成を促す神経ペプチドホルモン、MRCH、を分離し、構造を明らかにしている。また、アラタ体を不活性化するホルモン、allatostatin、尿の排泄を促す diuretic hormone など多数の neuropeptides が知られている。これらの peptides を害虫防除に利用するには、これらの遺伝子を植物や共生または病原微生物 (バキュロウイルスなど) に組み込んで、これを害虫に与え、害虫の正常な成育を抑制することが考えられる。既に、当研究室では、この研究に着手し、新しい成果を期待している。

発表論文

- 1) Mitsui, T., C. Nobusawa, K. Tokuda and M. Tada: Binding of UDP-*N*-acetylglucosamine to brush-border membrane vesicles of midgut epithelial cells of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. *J. Pesticide Sci.*, **11**, 65 (1986).
- 2) Tada, M., Y. Matsumoto, T. Mitsui, C. Nobusawa and J. Fukami: Inhibition of chitin synthesis by 1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea (CME-134) in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. *J.*

- Pesticide Sci.*, **11**, 189 (1986).
- 3) Mitsui, T.: Mode of inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron. "Chitin in Nature and Technology", ed. by R. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G. W. Gooday, Plenum Publishing Corp., New York, p. 193 (1986).
 - 4) Tada, M., T. Mitsui, K. Tokuda, R. Mengel and K. Wakabayashi: Penetration, absorption and translocation of 1-(3,5-dichloro-2,4-difluorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea, CME-134, in the larvae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. *J. Pesticide Sci.*, **12**, 455 (1987).
 - 5) 満井 喬: ベンゾイル尿素と昆虫表皮. 日本農芸化学会誌, **61**, 1605 (1987).
 - 6) Mitsui, T.: Chitin biosynthesis in insects "Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology", ed. by F. Sehnal, A. Zabza and D. L. Denlinger, Wroclaw Technical University Press, Wroclaw, p. 489 (1988).
 - 7) Tsutsumiuchi, K., T. Miyadai and T. Mitsui: Action of Ecdysone and Juvenile Hormone on Larval-Pupal Transformation of the Epidermis of the Cabbage Armyworm, *Mamestra brassicae* *In Vitro*, *J. Pesticide Sci.* **14**, 345 (1989).
 - 8) Nakagawa, Y., T. Sotomatsu, K. Irie, K. Kitahara, H. Iwamura and T. Fujita: Quantitative structure-activity studies of benzoylphenyl-urea larvicides. III. Effects of substituents at the benzoyl moiety. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **27**, 143 (1987).
 - 9) Sotomatsu, T., Y. Nakagawa and T. Fujita: Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. IV. Benzoyl *ortho* substituent effects and molecular conformation. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **27**, 156 (1987).
 - 10) Nakagawa, Y., T. Akagi, H. Iwamura and T. Fujita: Quantitative structure-activity studies of benzoylphenylurea larvicides. V. Substituted pyridyloxyphenyl and related derivatives. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **30**, 67 (1988).
 - 11) Nishimura, K., T. Kitahara, Y. Ikemoto and T. Fujita: Quantitative structure-activity studies of pyrethroids. 14. Physicochemical structural effects of tetramethrin and its related compounds of knockdown activity against house flies. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **31**, 155 (1988).
 - 12) Nishimura, K. and T. Fujita: Quantitative structure-activity studies of pyrethroids. 15. Physicochemical structural effects of tetramethrin and its related compounds on symptomatic and neurophysiological activities. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **33**, 158 (1989).